

ラット腸管粘膜下血管周囲のセロトニン含有神経の起源に関する免疫組織化学的研究

著者	張 陽
発行年	1998-03-24
URL	http://hdl.handle.net/10422/2487

氏名・(本籍)	張 陽 (中国)
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博士第282号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成10年3月24日
学位論文題目	ラット腸管粘膜下血管周囲のセロトニン含有神経の起源に関する免疫組織化学的研究

審査委員	主査 教授	服 部 隆 則
	副査 教授	前 田 敏 博
	副査 教授	小 玉 正 智

論文内容の要旨

【目 的】

消化管におけるセロトニン (5 HT) 含有神経は、壁内に細胞体を持つ内在性神経であることが知られている。われわれは最近の研究で、薬理学的に免疫反応を増強することで、5 HT神経線維がラット腸管の粘膜下血管周囲に濃密に分布することを見出した。血管周囲に分布する神経としては、交感神経節後線維と求心性知覚線維が知られている。いずれも外来性神経であるため、血管周囲の5 HT神経が内在性神経であるという定説と矛盾する。本研究では粘膜下血管周囲に分布する5 HT含有神経の起源を神経切除術と免疫組織化学を組み合わせることによって実験的に詳しく調べた。

【方 法】

Wistar系雄性ラットを、四つのグループに分けた。即ち、1) 無処理群、2) colchicine+pargyline投与群、3) colchicine+pargyline投与と椎前神経節切除群、4) capsaicin投与群とし、それぞれ6匹ずつ使用した。

免疫組織化学：実験動物は深麻酔下で、全身灌流し、十二指腸、空腸、回腸、椎前神経節および胸椎後根神経節を取り出し、固定した。20 μ m 水平凍結切片を作成した。5 HT抗体、Tyrosine hydroxylase (TH) 抗体、Calcitonin gene-related peptide (CGRP) 抗体およびSubstance P (SP) 抗体をそれぞれ1:10000倍に希釈し、切片に反応させた。内因性ペロキシダーゼを除去した後、anti-rabbit IgG抗体を1:1000に希釈した溶液で反応させた。ついでavidinbiotin-peroxidase complexを1:2000に希釈した溶液に反応させた。Nickel-DAB溶液に、切片を反応させ発色を観察した。発色後切片をスライドガラスに貼付け、アルコール脱水後、エンテランで封入した。

脊髄後根神経節のDAB/DAB-Nickel二重染色は、5 HT抗体で免疫組織化学を行い、Nickel-DAB溶液で染色した。CGRP抗体で免疫組織化学を行いニッケルを含まないDAB溶液で染色した。脊髄後根神経節の蛍光抗体二重染色は、5 HT抗体とSP抗体両方を含む溶液に切片を反応させ、FITC標識anti-rabbit IgGおよびTexas Red標識anti-guinea pig IgG第二抗体液に反応させた。50%グリセロールでカバーし、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

【結 果】

colchicine+pargyline処理群では、十二指腸、空腸、回腸の筋間神経叢に5 HT陽性神経細胞体が認められ、5 HT陽性線維は筋層、粘膜下層、粘膜固有層および粘膜下層の血管周囲に濃密に分布するのが認められた。TH抗体で同様の腸管部位の免疫組織化学を行うと、粘膜下層の血管周囲にTH陽性神経線維が濃密に分布するのが観察された。椎前神経節切除術とcolchicine+pargyline投与を組み合わせた動物では、筋間神経叢、筋層、粘膜下層、粘膜に分布する5 HT陽性神経線維の密度に変化は見られなかったが、粘膜下血管周囲の5 HT陽性神経線維はほぼ完全に消失した。また粘膜下血管周囲に分布するTH陽性神経線維も同様の処置でほぼ完全に消失した。腹腔神経節

を5-HTおよびTH抗体で染色したところ、TH陽性神経線維と細胞体は認められたが、5-HT陽性神経細胞体は認められず、5-HT陽性神経線維のみ観察された。胸椎後根神経節を5-HT抗体で染色したところ、5-HT陽性神経神経細胞体は神経節に分布することがわかった。5-HTとCGRPの二重染色を行い、5-HTを青色、CGRPを茶色で染め分けたところ、5-HTは大型細胞に染まり、CGRPは中型および小型細胞に染まった。一方、蛍光抗体二重染色で、5-HTを緑色、SPを赤色で染め分けたところ、5-HTはSPと同一の神経細胞体で共存することが明らかになった。椎前神経節にcapsaicin処理を行った動物では、粘膜下血管周囲に分布する5-HT陽性神経線維は著明に減少した。同様にcapsaicin処理動物で、腸管のCGRP、SPの免疫組織化学を行った結果、血管周囲のSP、CGRP陽性線維は著明に減少した。

【考 察】

椎前神経節切除術を施行すると、腸管壁の粘膜下血管周囲に分布する5-HT含有神経線維はほぼ完全に消失した。このことから粘膜下血管周囲に分布する5-HT線維は壁内に細胞体を有する内在性神経ではなく、外来性神経であることが示唆された。

椎前神経節切除によって影響を受ける外来性神経としては、交感神経の節後線維と求心性知覚神経が考えられる。前者の可能性を調べるために腹腔神経節を5-HTで染色した。その結果、5-HT陽性神経線維は認められたが、5-HT陽性神経細胞体は認められなかった。したがって、血管周囲の5-HT線維は、椎前神経節に細胞体を有する交感神経節後線維とは無関係であることが示唆された。

知覚神経節である胸椎後根神経節を5-HTで染色したところ、すべての神経節で中型あるいは大型の細胞体が陽性に染色された。後根神経節に存在するCGRPおよびSP含有神経細胞体と5-HT含有神経細胞体の関係を調べるために、CGRPと5-HT、またはSPと5-HTの二重染色を行った。その結果、後根神経節の神経細胞体においてCGRPと5-HTは共存せず、SPと5-HTは共存することが明らかになった。

さらに腸管の血管周囲に認められた5-HT含有神経線維が後根神経節の細胞体に由来するかどうかを調べる為にcapsaicinの急性投与で求心性知覚神経のブロックを行い免疫組織化学的に検索した。capsaicin投与後に血管周囲のCGRPおよびSP神経、さらに5-HT含有神経の著明な減少を観察した。

【結 論】

本研究により、ラット消化管に分布する5-HT含有神経は内在性と外来性に分けられ、粘膜下血管周囲に分布する5-HT含有神経線維は後根神経節に細胞体を有する求心性知覚神経である。後根神経節において、5-HTはSPと共存することがわかった。消化管の血流動態を中枢に伝えるのに5-HTが重要な役割を果たすことが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

消化管におけるSerotonin (5-HT) 含有神経は壁内に細胞体を持つ内在性神経であることが知られている。著者は薬剤投与によって、5-HT神経線維がラット腸管の粘膜下血管周囲に分布することを見出し、この5-HT含有神経が外来性神経であることを椎前神経節切除術と免疫組織化学を組み合わせる実験的に証明した。さらに、外来性交感神経の節後線維の可能性を調べるため、腹腔神経節を5-HTで染色したところ、5-HT含有神経細胞体は認められなかった。知覚神経節である胸椎後根神経節を5-HTで染色したところ、細胞体が陽性に染色された。後根神経節に存在するCalcitonin gene-related peptide (CGRP)、Substance P (SP) と5-HTの二重染色したところ、CGRPと5-HTは共存せず、SPと5-HTは共存することが明らかになった。腹腔神経節のcapsaicin処理によって、血管周囲に求心性知覚神経であるCGRPおよびSP神経の減少と5-HT含有神経の減少が観察された。したがって、血管周囲の5-HT含有神経は求心性知覚神経であることが明らかになった。

本研究は、ラット消化管に分布する5-HT含有神経は内在性と外来性に分けられ、血管周囲に分

布する 5-HT 含有神経線維は後根神経節に細胞体を有する求心性知覚神経で、消化管の血流動態を中枢に伝える重要な役割を有することを明らかにしたもので、博士（医学）の学位に値するものと認められた。

なお、本学位授与申請者は、平成10年2月6日実施の論文内容と、それに関連した試問を受け、合格と認められたものである。